

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 31/05, 31/70		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/56737 (43) Date de publication internationale: 11 novembre 1999 (11.11.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01063 (22) Date de dépôt international: 5 mai 1999 (05.05.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/05673 5 mai 1998 (05.05.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SAVOURET, Jean-François [FR/FR]; 4, avenue Hoche, F-94240 L'Hay-les-Roses (FR). CASPER, Robert-Frédéric [FR/FR]; 114, rue Saint-Dominique, F-75007 Paris (FR). MILGROM, Edwin [FR/FR]; 14, boulevard Colbert, F-92330 Sceaux (FR). (74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues. - brain = encéphale - cere brd = cérébral - Osteoporosis = ostéoporose	
(54) Title: ARYLHYDROCARBON RECEPTOR LIGAND ANTAGONISTS			
(54) Titre: ANTAGONISTES DES LIGANDS DU RECEPTEUR DES ARYLHYDROCARBURES			
(57) Abstract <p>The invention concerns arylhydrocarbon receptor ligand antagonists, characterised in that they are prepared from polyhydroxyl stilbenes, monomers or polymers or the corresponding glycosides, said compounds being in racemic form, or in the form of geometric isomers. The invention is useful for preparing medicines and foods for preventing or treating affections caused by and related to exposure to arylhydrocarbon ligands.</p>			
(57) Abrégé <p>L'invention concerne des antagonistes de ligands du récepteur d'arylhydrocarbures. Ces antagonistes sont caractérisés en ce qu'ils sont élaborés à partir de stilbènes polyhydroxylés, monomères ou polymères ou des glycosides correspondants, ces composés étant sous forme racémique, ou d'isomères géométriques. Applications pour la fabrication de médicaments, en diététique, et de manière générale pour fabriquer des médicaments et aliments afin de prévenir ou traiter les affections provoquées et liées à l'exposition à des ligands arylhydrocarbures.</p>			

Antagonistes des ligands du récepteur des
arylhydrocarbures

5 L'invention a pour objet des antagonistes du récepteur des aarylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés toxiques et leurs applications, notamment, pour la prévention et le traitement des intoxications et pathologies induites par ces polluants.

10 Les aarylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés, désignés ci-après en abrégé par ligands AhR, constituent des toxiques environnementaux. Il s'agit par exemple d'hydrocarbures halogénés (HAHs), d'hydrocarbures polyaromatiques halogénés (PAHs), de biphényles
15 polychlorés (PCBs), de polychlorodibenzodioxines (PCDD), dont la 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo (p)dioxine (TCDD), de polychloro-dibenzofuranes (PCDF), et de benzo(a)pyrène (BaP).

20 Ces ligands AhR, et en particulier la dioxine, ont récemment reçu beaucoup d'attention du fait de leur résistance à la dégradation et de leur longue demi-vie de plus de 10 ans dans le sol et de 4 à 12 ans dans le corps humain (sang et graisses).

25 Contrairement à une croyance répandue, l'exposition aux ligands AhR ne se limite pas à la proximité des sites industriels, de décharge, ou d'accidents de pollution. Toute personne sur terre est continuellement exposée aux

toxines activatrices du AhR provenant, entre autres, de la fumée de cigarette, des gaz d'échappement des moteurs à essence ou diesel, des émanations des fours industriels, de la viande cuite au barbecue, des produits laitiers et même du lait maternel (voir référence (1) ; les références bibliographiques sont données en fin de description).

Il existe maintenant suffisamment de preuves expérimentales et cliniques pour démontrer un lien entre l'exposition aux ligands AhR et de nombreuses pathologies, telles que l'athérosclérose (2), certains cancers (3), (4), (5), la dépression immunitaire (6), les allergies et certaines maladies de la peau (7).

En outre, les ligands AhR pourraient être impliqués dans l'étiologie de certaines stérilités ((8), (9)), et de la diminution de la résistance aux infections virales ((10) (11)).

Les effets biologiques des ligands AhR sont médiés par le récepteur des arylhydrocarbures (AhR), une protéine de 108 kDa, membre de la famille bHLH/PAS, qui est présente dans le cytosol des cellules de mammifères, pratiquement dans tous les tissus (pour revue: (12)).

Le complexe ligand/AhR est ensuite transporté dans le noyau par association avec une protéine nucléaire, ARNT ou "AhR nuclear translocator". Dans le noyau, ce complexe hétéromérique régule l'expression de certains gènes en se liant à l'ADN au niveau de séquences définies, les éléments de réponse à la dioxine (DRE), ou

les éléments de réponse xénobiotiques (XRE), qui répondent à la séquence T/GNGCGTG. Ces éléments sont localisés dans les gènes sensibles comme les cytochromes P-450 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, dénommés gènes de phase I.

5 Ces protéines, en particulier CYP1A1 et CYP1B1, sont impliquées dans le métabolisme des HAHs, PAHs et des dioxines, souvent pour conduire à des composés plus cancérigènes.

10 De plus l'induction de CYP1A1/AHH entraîne une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (ROS) qui provoquent la peroxydation des lipides, des lésions oxydatives de l'ADN et des tissus, et qui peuvent conduire à des phénomènes pathologiques de tératogénèse et carcinogénèse (13).

15 Les ligands AhR induisent aussi les enzymes dits de phase II (glutathion-S-transférase, aldéhyde-3-déhydrogénase, NAD(P)H quinone réductase), qui sont responsables de la détoxification et de l'excrétion des molécules xénobiotiques. Cette induction semble avoir
20 lieu par un mécanisme indirect mettant en jeu des éléments de réponse aux anti-oxydants dans les gènes concernés.

Ainsi les ligands AhR induisent une réponse transcriptionnelle complexe qui peut simultanément
25 provoquer des effets pathologiques et concourir à l'élimination des toxiques.

Les inventeurs ont entrepris d'identifier de nouveaux ligands du récepteur AhR. Pour ce faire, ils ont transfecté de façon stable une lignée de cellules de cancer du sein, T-47D, avec un gène rapporteur (la trans-
5 acétylase du chloramphénicol, ou CAT) placé sous le contrôle d'un élément de réponse à la dioxine ou DRE. La lignée T-47D est connue pour contenir un taux élevé de récepteur AhR (170 femtomoles/mg protéines).

Une cinquantaine de molécules ont été sélectionnées
10 sur la base de similitude structurale globale ou partielle avec la dioxine. Ces travaux ont montré la capacité de certains composés polyhydroxylés aromatiques à bloquer de manière spécifique la liaison des ligands AhR au récepteur AhR et l'induction consécutive des
15 enzymes de phase I par lesquels les AhR exercent leurs effets nocifs.

La plupart des composés ne se sont révélés ni agonistes, ni antagonistes de la dioxine. Ceux présentant une activité agoniste, excepté la quercétine, étaient en
20 revanche dépourvus d'activité antagoniste.

On mesurera donc l'intérêt des propriétés spécifiquement antagonistes des composés polyhydroxylés évoqués ci-dessus.

Mettant à profit le mécanisme de compétition pour
25 la liaison au récepteur AhR entre ces composés et les ligands AhR, l'invention a pour but de fournir des antagonistes de ce récepteur.

Elle vise également les applications de ces composés polyhydroxylés, chez l'homme et l'animal, notamment dans les domaines thérapeutiques, alimentaires et, de manière générale, pour prévenir ou traiter les affections dues aux effets toxiques résultant d'une exposition aux ligands AhR.

Les antagonistes des ligands du récepteur des arylhydrocarbures selon l'invention sont caractérisés en ce qu'ils sont élaborés à partir de stilbènes polyhydroxylés, monomères ou polymères, ou de leurs glycosides, ces composés étant sous forme racémique, ou d'isomères géométriques.

L'étude de ces composés par les inventeurs a en effet montré qu'ils sont capables d'inhiber les effets transcriptionnels des ligands AhR par un mécanisme de compétition pour la liaison au récepteur AhR.

On dispose ainsi de produits à effet anti-dioxine qui constituent donc des agents anti-pollution.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, lesdits stilbènes sont trihydroxylés, et en particulier sont constitués par les 3, 5, 4' - trihydroxystilbènes ou resvératrols, et notamment par le trans-resvératrol.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, lesdits stilbènes sont tétrahydroxylés. Des composés avantageux comprennent le 3, 4, 3', 5-tétrahydroxystilbène ou picéatannol et le 2, 3', 4, 5'-tétrahydroxystilbène ou oxyresvératrol.

Dans encore un autre mode de réalisation de l'invention, lesdits stilbènes sont dihydroxylés et comprennent, avantageusement, les 4, 4' - dihydroxystilbènes.

5 Les glycosides des stilbènes polyhydroxylés sont avantageusement des glucosides, des galactosides, des lactosides, des mannosides, des fructosides ou des picéosides. Le résidu sucre est sous forme monomère ou polymère.

10 Des travaux antérieurs avaient porté sur l'étude du rôle de polyphénols présents dans le vin, dont le resvératrol, dans divers processus pathologiques.

Des activités anti-cyclooxygénase, antioxydantes et anticancéreuse ont été évoquées, mais n'ont pas permis de
15 déboucher sur l'élaboration de formes galéniques permettant la mise au point de traitements efficaces.

On mesurera alors l'originalité de l'invention basée sur la mise en évidence d'un mécanisme complètement nouveau pour ces dérivés, l'inhibition du récepteur AhR,
20 et qui permet le développement d'applications dans de nombreux domaines, et tout spécialement dans un contexte polluant.

Ainsi, l'étude des antagonistes de l'invention a montré qu'ils sont capables d'inhiber ex vivo et in vivo
25 l'induction de gènes par les ligands AhR et les pathologies qui lui sont liées.

En particulier, ces antagonistes sont capables de bloquer l'induction des enzymes de phase I par les

ligands et de manière générale de protéger contre des effets transcriptionnels pathologiques liés à l'exposition à ces substances nocives.

L'invention vise donc leur utilisation pour la
5 prévention et le traitement d'affections provoquées par l'exposition à des ligands AhR.

A ce titre, l'invention vise l'utilisation des antagonistes définis ci-dessus pour la fabrication de médicaments destinés à la prévention et au traitement de
10 pathologies induites ou favorisées (dans le sens d'une aggravation d'une maladie préexistante) par les arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés dans un contexte d'exposition à ces polluants.

Ces médicaments renferment le ou lesdits
15 antagonistes en une quantité thérapeutiquement efficace et permettant d'obtenir l'effet antagoniste recherché vis-à-vis du récepteur d'arylhydrocarbures, en association avec un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

20 Dans l'utilisation selon l'invention, les médicaments se présentent sous une forme pour l'administration par voie orale, nasale, parentérale, topique.

Les médicaments ainsi élaborés se présentent sous
25 des formes appropriées pour l'administration par voie orale, telles que gouttes, gélules, sirop, sirop alcoolique, par voie nasale, telle que spray ou gouttes,

par voie parentérale, sous forme de solution dans un solvant approprié, ou encore par voie topique, telle que crème, pommade, shampooing ou lotion. Les véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables utilisés sont à
5 base d'huiles admises à la pharmacopée, ou d'un alcool comme l'éthanol (de 10 % à 100 %) ou de DMSO. De manière générale, il s'agit de solvants organiques non aqueux. On peut également avoir recours à une préparation lipidique telle que Intralipid[®].

10 On notera que lesdits stilbènes antagonistes sont solubles dans les excipients et/ou véhicules utilisés pour l'élaboration des médicaments.

La posologie dans les différentes formes et pour l'application quotidienne, sera établie, de manière
15 classique, selon le type d'effets à traiter.

A titre d'exemple, on administrera lesdits médicaments à base desdits antagonistes à raison de 0,1 mg à 5 g/jour, notamment de 20 mg à 200 mg/jour, en particulier de 10 à 100 mg/jour.

20 D'une manière avantageuse, les stilbènes polyhydroxylés utilisés, selon l'invention, comme antagonistes, présentent une grande innocuité et ne donnent pas lieu à des effets secondaires nocifs.

Les médicaments élaborés à partir de ces
25 antagonistes sont utilisables dans diverses pathologies impliquant des ligands AhR, comme l'athérogénèse, l'immunosuppression, le cancer, les infections virales telles que le SIDA, les allergies et maladies

dermatologiques associées à la dioxine et aux ligands AhR ainsi qu'à l'ostéoporose.

Divers travaux ont montré le rôle joué par les ligands AhR dans ces pathologies.

5 Ainsi, il a été démontré que, dans le système cardiovasculaire, les ligands AhR peuvent présenter des propriétés athérogènes par la perturbation des fonctions des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Les ligands AhR induisent CYP1A1/AHH dans les cellules
10 endothéliales de porc avec une DE_{50} (dose induisant 50% du phénomène) de 180 nM pour le BaP et 0.015 nM pour la TCDD (17). La stimulation de ces enzymes de phase I provoque une augmentation de la production de ROS (13) capable de provoquer des lésions membranaires dans les
15 cellules endothéliales et la peroxydation des lipides. Les LDL oxydées formées par ce mécanisme font l'objet d'une endocytose non régulée par un récepteur membranaire dédié qui conduit à une hyperaccumulation dans les
20 cellules endothéliales et à la formation de cellules d'aspect "mousse" (18).

 Outre les ligands AhR, l'acide arachidonique et les eicosanoides vasoactifs sont aussi des substrats pour CYP1A1/AHH. Il a été proposé que c'est entre autres par la perturbation du métabolisme de l'acide arachidonique
25 que les ligands AhR pourraient être athérogènes (19). Dans (2), les auteurs ont aussi montré que les ligands AhR peuvent léser les cellules endothéliales et modifier

leur perméabilité, ce qui pourrait conduire à une incorporation accrue de déchets des cholestérol-lipoprotéines dans la paroi artérielle conduisant à la formation d'athérome. Dans le cas des PCBs, cet effet n'est observé qu'avec les congénères qui lient AhR et induisent CYP1A1. De plus, ces mêmes PCBs augmentent le stress oxydatif et la peroxydation des lipides dans les cellules endothéliales en culture, phénomène qui a été corrélé dans le temps avec l'induction de CYP1A1 et qui pourrait être le mécanisme des lésions cellulaires.

On a également rapporté que les ligands AhR, comme la dioxine, sont de puissants immunosuppresseurs (6) et sont tumorigènes chez les rongeurs. A la suite de l'immunosuppression par les ligands AhR, on observe une diminution de la résistance aux agents infectieux (11). Les ligands AhR peuvent induire l'immunosuppression par de nombreux mécanismes: (20) à (28).

Le rôle des ligands AhR dans l'immunosuppression est soutenu par la présence du récepteur AhR, de ARNT ainsi que du gène inductible CYP1A1/AHH dans les lymphocytes (23).

Les ligands AhR sont également connus pour stimuler la réplication des virus (29). Il est généralement admis que l'activation des virus VIH-1 latents par les ligands AhR est un phénomène important dans la progression du syndrome humain d'immunodéficience acquise (SIDA) (29) et (10). Les ligands AhR activent l'expression du VIH-1 par l'induction de CYP 1A1 ainsi que par l'activation du

facteur NF-kappa B (29) et (10). Les gènes de ces deux protéines contiennent des sites DRE médiant l'activation du gène par le récepteur AhR, de même que le promoteur présent dans le LTR (long terminal repeat) du virus VIH.

5 De plus, les deux voies de pénétration du VIH dans les lymphocytes, les protéines membranaires CXCR4 et CD4 contiennent aussi des DRE dans les promoteurs de leurs gènes (voir tableau 2 dans les exemples).

Les ligands AhR sont également responsables

10 d'allergies et de maladies dermatologiques. Les hydrocarbures et la dioxine présents dans la fumée d'échappement de moteur diesel augmentent la production d'IgE par les lymphocytes B (30), ce qui contribue au développement d'affections allergiques de la peau et des

15 voies respiratoires. De plus, le gène de l'immunoglobuline E contient un DRE (tableau 2). La surproduction d'IgE est un trait caractéristique des phénomènes d'allergie.

Les ligands AhR sont de puissants inducteurs de la

20 chloracné. Dans tous les accidents industriels où ces composés ont été impliqués, (RFA, 1953; USA, 1964; Japon, 1968; Italie, 1976; Chine, 1977-79), la chloracné fut considérée comme le symptôme spécifique majeur de l'intoxication (7) et fut observée chez la majorité des

25 personnes exposées. Cette éruption acnéiforme s'observe à la suite d'une altération des processus de différenciation des cellules basales des glandes sébacées

et des kératinocytes (31). Ces cellules expriment des taux croissants du récepteur AhR durant leur différenciation (32). De plus, les ligands AhR eux-même augmentent la différenciation terminale des kératinocytes (31). Les ligands Ahr doivent alors induire des modifications cutanées spécifiques en activant le récepteur AhR, ce qui conduit à la modification de l'expression des gènes sensibles dans la peau.

Enfin, de nombreuses données épidémiologiques montrent que le tabagisme est un facteur de risque de l'ostéoporose chez l'homme comme chez la femme et (33). Ceci est confirmé par la relation proportionnelle quantitative qui existe entre le tabagisme et la diminution de la densité osseuse (34), 35 et (36) et par la corrélation entre tabagisme et risques de fractures (34), (37). Les ligands AhR présents dans le tabac pourraient exercer un effet négatif sur l'os de trois manières: 1) effet anti-estrogénique direct (voir (38) pour revue); 2) effet toxique direct sur l'os puisque le tissu osseux contient des récepteurs AhR (39) ; 3) effet toxique direct sur la fonction ovarienne: Les femmes qui fument font une ménopause plus précoce de 1 à 4 ans que celle ne fumant pas. Des expériences sur animaux démontrent un effect toxique direct du benzo(a)pyrène et des autres ligands AhR sur les oocytes.

De plus, la présence constante de sites DRE dans les gènes impliqués dans l'inflammation tels que IgE, cytokines, chemokines, leurs récepteurs ainsi que la NO

synthase inductible, suggère un rôle du récepteur AhR et de ses ligands dans les pathologies inflammatoires provoquées par une production excessive d'IgE et/ou d'oxyde nitreux NO par les cellules mononucléaires infiltrées dans les tissus à la suite de la sécrétion de chemokines chimio-attractives par ces tissus. On peut citer par exemple les dermatites atopiques, l'arthrite rhumatoïde, les maladies neurodégénératives (sclérose en plaque, sclérose amyotrophique), diabète, et avortements à répétition.

La présence de DRE dans les gènes des chemokines et/ou de leurs récepteurs renforce le lien entre ligands AhR, inflammation et états fébriles. La fièvre est provoquée par l'interaction de pyrogènes bactériens ou viraux avec les cellules immunocompétentes conduisant à la sécrétion d'une cascade de cytokines. Les cytokines dont l'association avec les états fébriles a été démontrée sont le TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 et le Macrophage Inflammatory Peptide (MIP-1). En outre, la fièvre périodique de la malaria semble être médiée par la sécrétion de TNF et de MIP-1 sous le contrôle de l'hémozoiné. Le tableau 4 montre que les gènes codant pour les récepteurs de IL-1, IL-8 et RANTES/MIP-1 contiennent tous des DRE dans leur régions promotrices. Les préparations pharmaceutiques de l'invention pourraient alors jouer un rôle modérateur au cours des

fièvres induites par l'interaction de ces cytokines avec leurs récepteurs.

En dernier lieu, la présence de sites DRE dans la séquence codante de la protéine PrP (ou prion de la maladie de Creutzfeld-Jacob) chez l'humain comme chez les bovins et dans le promoteur du gène de la préséniline (maladie d'Alzheimer) suggère que les ligands AhR puissent induire ou aggraver ces maladies neurodégénératives. En contrepartie, ces maladies pourraient être améliorées par administration de médicaments selon l'invention.

L'invention vise donc l'utilisation desdits antagonistes pour la fabrication de médicaments antiviraux pour prévenir ou réduire les troubles associés aux infections virales induites ou favorisées par les ligands AhR, comme le rhume ou la grippe, ou pour traiter les polyposes nasales, pour traiter l'activation des infections virales latentes par les ligands AhR, telle que le SIDA induit par VIH.

L'invention vise également leur utilisation pour la prévention de l'encéphalite spongiforme causée par la protéine PrP (prion) chez l'humain et les bovins.

L'invention vise encore leur utilisation pour la prévention de l'ostéoporose chez la femme à tous les âges de la vie et en particulier en post-ménopause et chez la femme âgée.

Elle vise en outre leur utilisation pour le traitement des états inflammatoires causés par la

production excessive d'oxyde nitreux et/ou d'IgE, notamment de dermatites atopiques, arthrite rhumatoïde, ostéo-arthrite, les maladies neurodégénératives (sclérose en plaques, sclérose amyotrophique) et diabète.

5 L'invention est également appropriée pour la fabrication de médicaments pour le traitement de dermatites, acné, lésions d'hyperkératose, eczéma, ainsi que pour le vieillissement de la peau et les rides.

10 L'utilisation desdits antagonistes pour la fabrication de médicaments anti-viraux pour réduire les états fébriles associés aux maladies infectieuses, virales et parasitaires entre également dans le champ de l'invention.

15 De même l'invention concerne l'utilisation de ces antagonistes pour la fabrication de médicaments pour le traitement des pathologies gynécologiques et endocriniennes telles que l'endométriose, les fibromes (léiomyomes), la pré-éclampsie et les avortements à répétition.

20 L'invention a également pour objet l'utilisation desdits antagonistes pour la fabrication de médicaments pour la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer.

25 Les effets inhibiteurs desdits stilbènes vis-à-vis des ligands AhR sont également avantageusement mis à profit en diététique.

L'invention vise également l'utilisation des antagonistes définis ci-dessus comme additifs alimentaires.

5 Elle vise ainsi des aliments caractérisés en ce qu'ils renferment au moins un antagoniste tel que défini ci-dessus en une quantité lui permettant d'exercer un effet inhibiteur vis-à-vis de ligands AhR, de manière à prévenir leurs effets nocifs. Ces aliments sont destinés à l'adulte ou à l'enfant.

10 Ces additifs sont incorporés dans l'alimentation, par exemple dans le lait en poudre, les préparations liquides ou solides (céréales) ou les aliments en conserve.

15 L'incorporation peut être réalisée durant l'élaboration des aliments ou lors de leur conditionnement, ou en utilisant des préparations avec les antagonistes déjà formulées, permettant d'effectuer la supplémentation désirée.

20 Les antagonistes utilisés selon l'invention sont particulièrement appropriés pour une supplémentation diététique de l'alimentation des enfants en bas âge nouveaux nés, nourrissons et très jeunes enfants dans un contexte d'exposition aux polluants aryhydrocarbures polycycliques et /ou halogénés.

25 La dose utilisée sera réduite par rapport à celle retenue pour un adulte, en tenant compte du poids de l'enfant et de son alimentation, de manière à obtenir une

concentration plasmatique efficace (de l'ordre du micromolaire).

Les antagonistes de l'invention présentent également un grand intérêt pour lutter contre les effets
5 du tabagisme, qui correspond à une exposition chronique aux ligands AhR.

Les ligands AhR sont présents dans la fumée de cigarette, en particulier des polychloro-dibenzo-p-dioxines (PCDD), dont la dioxine (TCDD), et des PAHs, dont le
10 benzo(a)pyrène (BaP). La somme de tous ces produits est équivalente à 4,3 pg/kg de poids corporel pour 20 cigarettes par jour. Chez le grand fumeur, la charge peut aller jusqu'à 0,05 mg/kg. Tous ces composés présents dans la fumée de cigarette sont capables d'induire
15 l'expression de CYP1A1/AHH dans les poumons (4), le placenta, les reins (41), les ovaires et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. L'induction de CYP1A1/AHH et des autres enzymes de la phase I conduit à la production de ROS qui provoquent des lésions
20 oxydatives sur l'ADN (43). La métabolisation des hydrocarbures polyaromatiques par CYP1A1/AHH résulte en outre en la production d'intermédiaires carcinogènes très réactifs (43) qui se lient à l'ADN pour former des adducts covalents.

25 Le tabagisme a été mis en cause directement dans l'occurrence d'au moins huit types différents de cancers humains dans le poumon, la vessie, le tractus intestinal,

et les lymphocytes (pour revue, voir (44)). Les ligands AhR ont été impliqués dans la genèse du cancer du poumon, par l'identification d'un polymorphisme génétique de CYP1A1. En outre, le tabagisme est une cause directe de
5 l'ischémie cardiaque, la principale cause de mortalité dans le monde occidental (44). Il existe aussi des données épidémiologiques qui relient le tabagisme à l'accélération du SIDA (10) ainsi qu'à l'ostéoporose (33), (34), (35).

10 On met à profit les propriétés avantageuses des antagonistes de l'invention en les utilisant pour imprégner les filtres de cigarette, afin de délivrer une dose d'antagoniste proportionnelle à la concentration de toxiques absorbée avec la fumée, et conduisant à une
15 concentration sanguine permettant de bloquer l'induction de CYP1A1 et des autres enzymes de phase I au niveau des organes en contact avec les arylhydrocarbures (voies respiratoires, poumon, rein, vessie).

Les stilbènes polyhydroxylés utilisés selon
20 l'invention sont obtenus par extraction à partir de végétaux, notamment en ce qui concerne les glycosides, ou par voie de synthèse. Les isomères géométriques, lorsqu'ils existent sont séparés selon les techniques classiques.

25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent qui se rapportent, à titre illustratif, au trans-resvératrol, qui sera appelé Resvératrol.

Dans ces exemples, les figures 1 à 7 représentent :

- les figures 1A et 1B, les courbes d'induction (nombre de fois) d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un élément de réponse à la dioxine, transfecté dans la lignée T-47 D, en fonction de la concentration en TCDD, en présence de TCDD seule ou de TCDD+ Resvératrol (1A), et d'inhibition de l'induction par TCDD (en %) de ce gène en fonction de la concentration en Resvératrol, (1B),
- la figure 2, l'inhibition par le Resvératrol de l'induction de CYP1A1 par TCDD dans les cellules T-47D,
- la figure 3, les courbes de compétition de liaison au récepteur AhR entre TCDD, α NF, le Resvératrol, l'indole-3-carbinol, dans le cytosol de foie de lapin,
- la figure 4, l'activité estrogénique de l'oestradiol comparé à celle du Resvératrol, à différentes concentrations, sur un gène rapporteur oestrogéno-dépendant transfecté de façon transitoire dans les cellules T-47D,
- la figure 5, la régulation de l'activité NAD(P)H quinone réductase par TCDD et ses antagonistes dans les cellules T-47D,
- la figure 6, la répression de l'induction du promoteur du LTR de VIH (VIH-LTR-CAT) par TCDD dans les cellules T-47D, et

- la figure 7, l'inhibition de l'induction *in vivo* de Cyp 1A1 chez le rat par l'association benzo [a] pyrène/DMBA.

5 . Inhibition de l'induction de la transcription des enzymes de phase I par les ligands AhR.

On transfecte de manière stable la lignée T-47D de cellules de cancer du sein avec un gène rapporteur, la trans-acétylase du chloramphénicol, CAT en abrégé, placé sous le contrôle d'un élément de réponse à la dioxine.

10 On rapporte sur la figure 1A, en fonction de la concentration en TCDD (-log M) (nombre de fois), l'induction de CAT en présence de TCDD seule (courbe ■) et de TCDD avec 10^{-6} M de Resvératrol (courbe ▷).

15 L'examen des résultats obtenus montre l'effet inhibiteur de Resvératrol vis-à-vis de l'induction de la transcription des enzymes de phase I par TCDD.

La figure 1B donne l'inhibition par le Resvératrol de l'induction en % de CAT en fonction de la concentration en TCDD (-log M). On constate que
20 l'inhibition observée est dose-dépendante.

 . Inhibition de l'induction de la protéine Cyp1A1 par la dioxine.

On mesure l'expression de la protéine CYP1A1 *in vivo* en réponse à une concentration efficace de TCDD (10^{-10} M), en présence ou en l'absence de Resvératrol.
25

Les cellules T-47D sont cultivées dans le DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal et traitées 48h par l'éthanol seul (témoin), 10^{-10} M dioxine (TCDD),

10⁻⁶ M Resvératrol (ResV), une combinaison de dioxine et Resvératrol (TCDD + ResV), 10⁻⁶ M α -naphthoflavone (α -NF) ou une combinaison de dioxine et α -naphthoflavone (TCDD + α -NF). Les cellules sont collectées et lavées dans le
5 PBS, puis lysées par fusion-congélation répétée en conditions isotoniques. 75 μ g de protéines sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Le gel est transféré sur une membrane de nylon. La membrane est saturée avec 5 % de lait écrémé et
10 incubée avec un anticorps polyclonal de lapin (Daiichi Pure Chemicals Co, Japan) contre Cyp1A1. Les immuncomplexes sont détectés par chimioluminescence avec le kit Renaissance (DuPont).

La figure 2 correspond à la photo du Western blot.

15 La flèche montre la bande spécifique de Cyp1A1, les astérisques signalent des bandes non-spécifiques.

On observe que le Resvératrol à une concentration de 10⁻⁶ M inhibe l'induction de la protéine CYP1A1 d'environ 60%.

20 L'effet inhibiteur du Resvératrol est légèrement inférieur à celui de l'antagoniste classique de la dioxine, l' α -7,8-benzoflavone (ou α -naphthoflavone; α NF). En revanche, ce dernier composé, à la différence du Resvératrol, présente des effets agonistes autant
25 qu'antagonistes à la concentration de 10⁻⁵M alors que le resvératrol est un pur antagoniste.

Ces résultats confirment que le Resvératrol est capable de bloquer l'induction de gènes sensibles aux ligands AhR, tels que CYP1A1/AHH et les autres enzymes de phase I.

5

. Etude de l'activité antagoniste du Resvératrol

On a mesuré la capacité du Resvératrol de déplacer la dioxine radioactive (dioxine [2,6, di³H], 28 Ci/mmoles, Terrachem, Kansas, USA) de son récepteur en comparaison avec d'autres ligands tels que l' α -NF ou l'indole-3-carbinol. On a utilisé un cytosol de foie de lapin pour ces études de compétition, car le lapin possède un récepteur AhR dont l'affinité est identique à celle du récepteur humain, à la différence du récepteur de souris.

On rapporte sur la figure 3 le % de liaison spécifique au récepteur AhR en fonction de la concentration (M) en dioxine marquée au tritium (■), en présence de concentrations croissantes de α -naphtoflavone (○), de Resvératrol (●), et d'indole-3-carbinol (¹³C).

On observe que dans ce modèle, la dioxine et l' α -NF déplacent la dioxine marquée de son récepteur avec un Kd apparent de $3 \cdot 10^{-9}$ M. Le Resvératrol déplace aussi la dioxine, bien qu'avec une affinité plus faible ($6 \cdot 10^{-6}$ M). Le Resvératrol montre une affinité plus forte que l'autre ligand naturel, l'indole-3-carbinol. Ces résultats

démontrent que le Resvératrol exerce ses effets antagonistes par compétition pour le récepteur AhR.

. Etude d'effets de type stéroïdien

On a transfecté de façon transitoire les cellules
5 T-47D avec différentes constructions CAT sous contrôle de
l'élément de réponse à l'estradiol (ERE) du gène de la
vitellogénine ou celui, plus faible, du gène du récepteur
de la progestérone, ainsi que des éléments de réponse à
la progestérone (PRE) et aux androgènes (ARE) du virus
10 murin MMTV et d'un élément de réponse à la vitamine D
(VDRE) synthétique.

La figure 4 donne l'induction de CAT pour
l'oestradiol (E2) 10^{-10} M, le Resvératrol (ResV) 10^{-7} M,
5 x 10^{-7} M, 10^{-6} M, 5 x 10^{-6} M, 10^{-5} M et 5 x 10^{-5} M.

15 Le Resvératrol n'a exercé aucun effet sur les PRE,
ARE ou VDRE. Le Resvératrol a présenté un faible effet
estrogénique sur l'ERE du gène de la vitellogénine,
équivalent à 1/500.000 ème de l'effet de l'estradiol. La
courbe dose-réponse montre qu'on observe à partir de 10^{-5}
20 M de Resvératrol un effet équivalent au 1/5ème de celui
de 10^{-10} M d'estradiol. Cette concentration d'estradiol
est celle retrouvée dans le sang des humains de sexe
masculin.

. Régulation de l'activité NAD(P)H quinone
25 réductase par la dioxine et ses antagonistes dans les
cellules T-47D.

Les cellules T-47D ont été cultivées pendant 72 h en l'absence (ctl) ou en présence de dioxine 10^{-9} M (TCDD), Resvératrol 10^{-6} M (Res), α -naphthoflavone 10^{-6} M (α -NF), isolément ou selon les combinaisons indiquées.

5 L'activité NQOR correspondante exprimée en nanomoles de cytochrome c réduit, par mg de protéines, par min, est donnée sur la figure 5.

Il est intéressant de noter que ni le Resvératrol ni l' α -NF ne répriment l'induction indirecte des enzymes

10 de phase II provoquée par la dioxine ou la NAD(P)H quinone réductase. Cet effet bénéfique est ainsi conservé.

Des résultats similaires sont obtenus pour la GST-Ya.

15 . Etude de l'inhibition par le Resvératrol de l'induction d'autres gènes par les ligands AhR.

On a recherché, dans les banques de données EMBL et GENBANK, les gènes humains contenant des DRE dans leurs régions promotrices, en utilisant les consensus T/GNGCGTG

20 dans les deux orientations possibles. En dehors des gènes des enzymes de phase I, on a découvert une population restreinte de gènes contenant un ou plusieurs DRE et donc susceptibles d'être régulés par les ligands AhR et le Resvératrol.

25 Ces gènes sont présentés dans les tableaux 1, 2 et 3 en fonction de leur association à des mécanismes physiologiques ou des états pathologiques distincts.

Le tableau 1 montre les gènes impliqués dans les régulations hormonales, le métabolisme des lipides, les maladies génétiques ou dégénératives, les cancers.

Le tableau 2 montre les gènes des cytokines et de
5 leurs récepteurs qui sont impliqués dans le chimiotactisme et l'inflammation.

Le tableau 3 montre les virus et certaines protéines cellulaires qui interagissent avec eux.

Tableau 1

GENES	Numéro d'ACCESSION	SITES (Nbre)	LOCALISATION	COMMENTAIRE
Récepteur des Glucocorticoïdes	U10430	8	promoteur	
Enzymes				
NOS inducible	X97821	4	promoteur	
NOS endothéliale	U24214	1	promoteur	
Cyclooxygénase 2	U20548	1	promoteur	
PG H Synthase	U44805	1	promoteur	
PG endoperoxide synthase	M31812	1	promoteur	
5-Lipoxygénase	M38191	5	promoteur, cds	
15-lipoxygénase	U63384	1	promoteur	
Phospholipase A2	U11239	2	promoteur	
Thromboxane A2 récepteur	D15054	1	promoteur	
Recepteurs				
PDGF chaîne A	U40769	2	promoteur	
IGF-1 récepteur	M69229	6	promoteur	
VEGF récepteur	D64016	2	promoteur	
Gènes impliqués en pathologie humaine				
Protéine APC	U02509	2	promoteur, cds	polypes du colon spécifique du cerveau multiple variants
Protéine APC	D13981	1	exon supplémentaire	
Protéine APC	D13980	1	5' UTR	
Prion Humain	D00015	2	cds	gène bovin obésité Alzheimer lésions de l'ADN
[Prion bovin]	D26150	1	intron 1	
Ob (leptine)	U43589	2	promoteur	
préséniline	L76518	1	promoteur	
GADD p153	S40707	2	promoteur	
Oncogènes				
WT 1b	S77896	1	promoteur	Tumeurs de Wilm
WNT-5A	U39837	3	promoteur	
PCNA	J05614	1	promoteur	
p53	J04238	17	complete gene	apoptose et cycle cellulaire
p53	J04238	1	promoteur	
c-Ha-Ras	M13221	1	promoteur	
c-jun	U60581	3	promoteur	
c-myc p64	M13930	4	promoteur	
c-raf	M38134	2	promoteur	
ATF 3	U37542	2	promoteur	

Tableau 1: Gènes humains contenant des DRE dans leur séquences régulatrices. Le gène du Prion bovin est aussi mentionné. Cds: séquence codante. UTR: région non traduite.

Tableau 2

GENES	Numéro d'ACCESSION	LOCALISATION	SITES (Nbre)	COMMENTAIRE
Interleukines, Chemokines				
TNF	E01052	cds	1	
IL 7	M29048	promoteur	1	
IL 10	X73536	promoteur	1	
IL1-RA	U65590	gene (introns)	4	
RANTES	S64885	promoteur	1	
LIGHT	AF03581	cds	1	tnf-like
LIT	AF033854	cds	1	
CD40 ligand	D31793	promoteur	1	gp39 tnf-like
SCM 1 alpha	D63790	cds	2	
MDC	U83171	cds	1	
Eotaxine	U46572	cds	1	chemokine
STCP-1	U82992	cds	2	T-cell chemokine
Netrine-2 like	U86758	cds	16	
Récepteurs				
IL-1 récepteur 1	AF054830	cds	1	
IL-1 récepteur 2	X59770	cds	1	
IL-2 récepteur a	U57613	promoteur	3	
IL-2 récepteur b	X53093	promoteur	1	
IL-8 récepteur a	U11870	promoteur	3	
IL-8 récepteur b	U11866	promoteur	1	
IL 10 récepteur	U00672	cds	1	
CXCR4	AF005058	promoteur, cds	9	HIV co-récepteur
DARC	Y14873	5'UTR	3	
CCR6	U45984	cds	1	
TNF récepteur p75/80	U53483, S63368	promoteur, cds	6	
RANTES/MIP1 récepteur	L10918	cds	2	
DR3	AF026070	cds	1	tnf-like récepteur
decoy récepteur 2	AF029761	5'UTR	1	tnf-like récepteur
interferon γ récepteur 2	U68755	promoteur	3	
VEGF récepteur	D64016	promoteur	2	
Protéines d'Adhésion				
connexine 32	L47127	5' UTR	1	
connexine43	U64573	promoteur, cds	3	
ICAM (CD54)	M65001	promoteur, cds	4	
Gènes en relation.				
Ig E	M55420	cds	2	région variable
IgE	S71428	cds	4	isoforme
CD23 p45	X06049	promoteur	1	IgE récepteur
NF-IL3	S79880	cds	1	
NF Kappa B p65	L01459	promoteur	2	
NF Kappa B p50	S57113	promoteur	1	
I kappa B alpha	U08468	promoteur	2	
RANKL	AF0190047	cds	1	

Tableau 2: Gènes associés au chimiotactisme et à l'inflammation et contenant des DRE dans

Tableau 3

VIRUS HUMAINS et gènes associés	Numéro d' ACCESSION	LOCALISATION	SITES (Nbre)	COMMENTAIRE
Cytomegalovirus IE-1	M64941	promoteur	1	
HTLV-1	S76263	5'LTR	1	présent dans tous les isolats
HTLV-1	S76263	gène TAX	1	
HTLV-4	X06392	5'LTR	2	
HIV 1 isolat BRU (LAV-1)	K02013	3' LTR	1	
HIV 2	U22047	génom	2	
HIV2 EHO	U27200	génom	1	
CD4	U01066	promoteur	1	
CD4	S79267	cds	2	
CXCR4	AF005058	promoteur, cds	9	
Papilloma Virus (HPV)	X52061	génom lcr	1	"long control region"
HPV 11	J04351	génom	2	
HPV 16	M33616	génom	1	
HPV 25	D50264	promoteur	1	
HPV 33, 47, 58 59		génom		
Poliovirus 1	X70509	5'UTR	1	
Rhinovirus 1B	D00239	génom	2	
Rhinovirus 2, 14, 89		génom		
Herpes virus HSV1	U18080	génom	1	IE transactivateur segment "a"
Herpes virus HSV1	M13885	génom	1	
Hépatite A virus	K02990	génom	1	
Hépatite B virus	X98077	génom	1	
Hépatite C virus	D30613	génom	4	
Adenovirus type 2	J01917	génom	21	TR droit gène E1A protéine liant les complexes HLA E1A gene
Adenovirus type 12	J01910	génom	1	
Adenovirus type 12	X14757	promoteur	1	
Adenovirus type 19A	X95259	early region 3	1	
Adenovirus type 41	M18289	génom	1	
Virus syncytial respiratoire	M17212	cds	1	protéine d'ancrage Protéines M1, M2 matrix, hémagglutinine, neuraminidase, ARN polymérase
Influenza virus, tous sous-types.		génom: sites multiple dans divers gènes		

Tableau 3: Génomes viraux ou gènes contenant des DRE's. UTR: région non traduite. LTR: longue région répétée terminale. IE: gènes d'expression immédiate précoce. Cds: séquence codante. TR: séquence répétée terminale

Pour tester cette hypothèse, selon laquelle les gènes possédant des DRE dans leur promoteur seraient
5 généralement sensibles aux ligands AhR et que cet effet pourrait être inhibé par le Resvératrol, on a choisi comme modèle représentatif le promoteur de la séquence répétée (LTR) de VIH-1, qui contient un DRE typique. On a transfecté les cellules T-47D avec une construction CAT
10 contenant ce promoteur (-452/+77). Les cellules ont ensuite été traitées par la dioxine (10^{-9} M) ou le Resvératrol (10^{-6} M), seuls ou en association ($p = 0,01$).

La dioxine a induit le promoteur de VIH par un facteur de 3 et cette induction a été totalement
15 supprimée par le Resvératrol.

Ces résultats démontrent donc que des concentrations de Resvératrol, de l'ordre de celles utilisables en thérapeutique humaine, sont capables de bloquer l'induction des enzymes de phase I et du promoteur du VIH
20 par les ligands AhR. De la même manière, le Resvératrol s'avère capable de protéger contre d'autres effets transcriptionnels pathologiques liés à l'exposition à ces substances nocives.

. Etude du Resvératrol en tant qu'antagoniste des
25 ligands AhR in vivo.

Des rats Sprague-Dawley femelle ont été traités par une combinaison de Benzol [a]pyrène et de DMBA (diméthylbenzanthrène), deux ligands AhR présents dans la fumée de cigarette. Des expériences préliminaires ont montré que cyp 1A1 était induit à partir de 1 mg/kg des deux ligands administrés ensemble. Ce traitement a ensuite été répété en présence ou absence de resvératrol à doses croissantes (1 et 5 mg/kg). Les animaux ont été sacrifiés et les organes prélevés. Des extraits cellulaires totaux ont été préparés et analysés par immunoblot pour détecter l'expression de cyp 1A1 dans ces tissus.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 7 où les lignes 1 à 7 correspondent respectivement à :

- Ligne 1 : 1 mg/kg BaP/DMBA
- Ligne 2 : 1 mg/kg BaP/DMBA plus 1 mg/kg resvératrol
- Ligne 3 : 1 mg/kg BaP/DMBA plus 5 mg/kg resvératrol
- Ligne 4 : 5 mg/kg resvératrol
- Ligne 5 : véhicule seul (huile d'olive)

Chaque ligne contient 30 µg (poumon) ou 60 µg (rein) de protéines.

Comme le montre la figure 7, l'association BaP/DMBA provoque l'expression de cyp 1A1 dans le poumon et le rein. Cette induction est totalement supprimée par le resvératrol, dans les conditions de concentration égale des substances, montrant que le resvératrol est plus actif *in vivo* que *ex vivo*, où un excès de 5000 fois est nécessaire pour observer l'inhibition. Cette

observation est en faveur d'une métabolisation du resvératrol en un composé plus actif dans l'animal, le resvératrol agissant ainsi comme une "pro-drogue".

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1/ Bock, K. W. (1994). Aryl hydrocarbon or dioxin
5 receptor: biologic and toxic responses. Rev Physiol
Biochem Pharmacol 125, 1-42.
- 2/ Toborek, M., Barger, S. W., Mattson, M. P.,
Espandiar, P., Robertson, L. W., and Hennig, B. (1995).
10 Exposure to polychlorinated biphenyls causes endothelial
cell dysfunction. J Biochem Toxicol 10, 219-226.
- 3/ Kleman M, Gustafsson J-A. (1996). Interactions of
procarcinogenic heterocyclic amines and indolocarbazoles
15 with the dioxin receptor. Biol Chem 377:741-762.
- 4/ Bartsch, H., Petruzzelli, S., De Flora, S., Hietanen,
E., Camus, A. M., Castegnaro, M., Alexandrov, K., Rojas,
M., Saracci, R., and Giuntini, C. (1992). Carcinogen
20 metabolism in human lung tissues and the effect of
tobacco smoking: results from a case-control multicenter
study on lung cancer patients. Environ Health Perspect
98, 119-24.
- 25 5/ Nebert, D. W., Puga, A., and Vasiliou, V. (1993). Role
of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene
battery in toxicity, cancer, and signal transduction.

[Review] [75 refs]. Annals of the New York Academy of Sciences 685, 624-40.

5 6/ Kerkvliet, N. I. (1995). Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. Environ Health Perspect 103 Suppl 9, 47-53.

10 7/ Suskind, R. R. (1985). Chloracne, "the hallmark of dioxin intoxication". Scand J Work Environ Health 11, 165-71.

15 8/ Mattison DR, Plowchalk DR, Meadows MJ, Miller MM, Malek A, London S. The effect of smoking on oogenesis, fertilization and implantation. Sem Reprod Health 7:291-304, 1989

20 9/ Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL. (1993). Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Fundamental & Applied Toxicology 21:433-41.

25 10/ Yao, Y., Hoffer, A., Chang, C. Y., and Puga, A. (1995). Dioxin activates HIV-1 gene expression by an oxidative stress pathway requiring a functional cytochrome P450 CYP1A1 enzyme. Environ Health Perspect 103, 366-71.

- 11/ Burleson, G. R., Lebrec, H., Yang, Y. G., Ibanes, J. D., Pennington, K. N., and Birnbaum, L. S. (1996). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. *Fundam Appl Toxicol* 29, 40-7.
- 12/ Rowlands JC, Gustafsson J-A. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 27:109-34.
- 13/ Park, J. Y., Shigenaga, M. K., and Ames, B. N. (1996). Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2322-7.
- 14/ Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. (1996). Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine or spirits? *Br Med J* 312:731-6.
- 15/ Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochemistry* 30:91-113.
- 16/ Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta

RG, Moon RC, Pezzuto JM. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 275:218-20.

5 17/ Stegeman JJ, Hahn ME, Weisbrod R, Woodin BR, Joy JS, Najibi S, Cohen RA. (1995) Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells. Molecular Pharmacology 47:296-
10 306.

18/ Steinberg D, Parsatharathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of the low density lipoprotein that increase its
15 atherogenicity. N Engl J Med 320:915-24.

19/ Rifkind AB, Gannon M, Gross SS. (1990). Arachidionic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450: a new hypothesis on the rôle of P-450 in dioxin toxicity.
20 Biochem Biophys Res Commun 172:1180-88.

20/ Blaylock, B. L., Holladay, S. D., Comment, C. E., Heindel, J. J., and Luster, M. I. (1992). Exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte
25 maturation. Toxicol Appl Pharmacol 112, 207-13.

- 21/ De Heer, C., Verlaan, A. P., Penninks, A. H., Vos, J. G., Schuurman, H. J., and Van Loveren, H. (1994). Time course of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced thymic atrophy in the Wistar rat. Toxicology & Applied Pharmacology 128, 97-104.
- 22/ Yoo, B. S., Jung, K. H., Hana, S. B., and Kim, H. M. (1997). Apoptosis-mediated immunotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) in murine splenocytes. Toxicol Lett 91, 83-9.
- 23/ Masten, S. A., and Shiverick, K. T. (1996). Characterization of the aryl hydrocarbon receptor complex in human B lymphocytes: evidence for a distinct nuclear DNA-binding form. Arch Biochem Biophys 336, 297-308.
- 24/ Gehrs, B. C., Riddle, M. M., Williams, W. C., and Smialowicz, R. J. (1997). Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: II. Effects on the pup and the adult. Toxicology 122, 229-40.
- 25/ Yang, Y. G., Lebrec, H., and Burleson, G. R. (1994). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on pulmonary influenza virus titer and natural killer (NK) activity in rats. Fundamental & Applied Toxicology 23, 125-31.

- 26/ Kamath, A. B., Xu, H., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (1997). Evidence for the induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 142, 367-77.
- 5
- 27/ Yin, H., Li, Y., and Sutter, T. R. (1994). Dioxin-enhanced expression of interleukin-1 beta in human epidermal keratinocytes: potential role in the modulation of immune and inflammatory responses. *Exp Clin Immunogenet* 11, 128-35.
- 10
- 28/ Fan, F., Yan, B., Wood, G., Viluksela, M., and Rozman, K. K. (1997). Cytokines (IL-1beta and TNFalpha) in relation to biochemical and immunological effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicology* 116, 9-16.
- 15
- 29/ Gollapudi S, Kim CH, Patel A, Sindhu R, Gupta S. (1996). Dioxin activates human immunodeficiency virus-1 expression in chronically infected promonocytic U1 cells by enhancing NF-kappaB activity and production of tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 226:889-894.
- 20
- 30/ Takenaka, H., Zhang, K., Diaz-Sanchez, D., Tsien A. and Saxon, A. (1995) Enhanced IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel
- 25
-

exhaust: direct effect on B-cell production. J. Allergy Clin. Immunol. 95, 103-115.

31/ Berkers, J. A., Hassing, I., Spenkelink, B., Brouwer,
5 A., and Blaauboer, B. J. (1995). Interactive effects of
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and retinoids on
proliferation and differentiation in cultured human
keratinocytes: quantification of cross-linked envelope
formation. Arch Toxicol 69, 368-78.

10

32/ Wanner, R., Panteleyev, A., Henz, B. M., and
Rosenbach, T. (1996). Retinoic acid affects the
expression rate of the differentiation-related genes
aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in
15 proliferative keratinocytes only. Biochim Biophys Acta
1317, 105-11.

33/ Franceschi S, Schinella D, Bidoli E, Dal Maso L,
LaVecchia C, Parazzini F, Zecchin R. The influence of
20 body size, smoking, and diet on bone density in pre-and
postmenopausal women. Epidemiology 7(4):411-4, 1996

34/ Grisso JA, Kelsey JL, O'Brien LA, Miles CG, Sidney S,
Maislin G, LaPann K, Moritz D, Peters B. Risk factors for
25 hip fracture in men. Hip fracture study group. Am J of
Epidemiology 145(9):786-93, 1997

- 35/ Egger P, Duggleby S, Hobbs R, Fall C, Cooper C. Cigarette smoking and bone mineral density in the elderly. *J or Epidemiology & Community Health* 50(1):47-50, 1996
- 5 36/ Hopper JL, Seeman E. (1994). The bone density of female twins discordant for tobacco use. *N Engl J Med* 330:387-392.
- 10 37/ Johansson C, Mellstrom D, An earlier fracture as a risk factor for new fracture and its association with smoking and menopausal age in women. *Maturitas* 24(1-2):97-106, 1996.
- 15 38/ Safe, S., and Krishnan, V. (1995). Chlorinated hydrocarbons: estrogens and antiestrogens. *Toxicol Lett* 82-83, 731-736.
- 20 39/ Abbott, B.D. (1995). Review of the interaction between TCDD and glucocorticoids in embryonic palate. *Toxicology* 105, 365-73.
- 25 40/ Gurtoo, H. L., Williams, C. J., Gottlieb, K., Mulhern, A. I., Caballes, L., Vaught, J. B., Marinello, A. J., and Bansal, S. K. (1983). Population distribution of placental benzo(a)pyrene metabolism in smokers. *Int J Cancer* 31, 29-37.

41/ Bilimoria, M. H., and Ecobichon, D. J. (1980).
Responses of rodent hepatic, renal and pulmonary aryl
hydrocarbon hydroxylase following exposure to cigarette
5 smoke. Toxicology 15, 83-9.

42/ Mattison DR, Thorgeirsson SS. Smoking and industrial
pollution and their effects on menopause and ovarian
cancer. Lancet 1:187-88, 1978

10

43/ Kiyohara, C., Hirohata, T., and Inutsuka, S. (1996).
The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and
polymorphisms of the CYP1A1 gene. Japanese Journal of
Cancer Research 87, 18-24.

15

44/ Boyle P. (1997). Cancer, cigarette smoking and
premature death in Europe: a review including the
recommendations of European cancer experts consensus
meeting, Helsinki, October 1996. Lung Cancer 17:1-60.

20

REVENDICATIONS

5 1/ Antagonistes de ligands du récepteur
d'arylhydrocarbures, caractérisés en ce qu'ils sont
élaborés à partir de stilbènes polyhydroxylés, monomères
ou polymères ou des glycosides correspondants, ces
composés étant sous forme racémique, ou d'isomères
géométriques.

10 2/ Antagonistes selon la revendications 1,
caractérisés en ce que lesdits stilbènes sont
trihydroxylés, et en particulier sont constitués par les
3, 5, 4'-trihydroxystilbène cis et trans ou resvératrols,
et notamment par le trans resvératrol.

15 3/ Antagonistes selon la revendication 1,
caractérisés en ce que lesdits stilbènes sont
tétrahydroxylés et en particulier comprennent les 3, 4,
3', 5-tétrahydroxystilbènes ou picéatannols, et les 2,
3', 4, 5'-tétrahydroxystilbènes ou oxyresvératrols.

20 4/ Antagonistes selon la revendication 1,
caractérisés en ce que lesdits stilbènes sont
dihydroxylés et comprennent les 4, 4'-dihydroxystilbènes.

25 5/ Antagonistes selon l'une quelconque des
revendications précédentes, caractérisés en ce que
lesdits glycosides sont des glucosides, des galactosides,
des mannosides.

6/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la prévention ou le traitement d'affections provoquées par l'exposition à des ligands arylhydrocarbures.

5 7/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la fabrication de médicaments destinés à la prévention et au traitement de pathologies induites ou favorisées par les arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés dans un
10 contexte d'exposition à ces polluants.

8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que lesdits médicaments se présentent sous une forme pour l'administration par voie orale, nasale, parentérale ou topique.

15 9/ Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que lesdits médicaments se présentent sous forme de gélule, gouttes, sirop, sirop alcoolique, pour une administration par voie orale, de spray ou gouttes pour une administration par voie nasale, de
20 solution pour une administration par voie parentérale et de crème, pommade, ou shampooing ou de lotion pour une application par voie topique, le véhicule comprenant une huile ou un alcool pharmaceutiquement acceptable.

10/ Utilisation selon l'une quelconque des
25 revendications 7 à 9, caractérisée en ce que lesdits médicaments sont administrés à raison de 0,1 mg à 5 g/jour, notamment de 20 à 200 mg/jour, et en particulier de 10 à 100 mg/jour.

11/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la fabrication de médicaments anti-viraux, pour prévenir les troubles associés aux infections virales induites ou favorisées par les ligands AhR, comme le rhume ou la grippe, ou pour traiter les polyposes nasales, pour traiter l'activation des infections virales latentes par les ligands AhR, telle que le SIDA induit par VIH.

12/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la prévention de l'encéphalite spongiforme causée par la protéine PrP (prion) chez l'humain et les bovins.

13/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la prévention de l'ostéoporose chez la femme à tous les âges de la vie et en particulier en post-ménopause et chez la femme âgée.

14/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour le traitement des états inflammatoires causés par la production excessive d'oxyde nitreux et/ou d'IgE, notamment de dermatites atopiques, arthrite rhumatoïde, ostéo-arthrite, les maladies neurodégénératives (sclérose en plaques, sclérose amyotrophique) et diabète.

15/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour réduire les états fébriles associés aux maladies infectieuses, virales et parasitaires.

16/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour le traitement des pathologies gynécologiques et endocriniennes telles que l'endométriase, les fibromes (léiomyomes), la pré-
5 éclampsie et les avortements à répétition.

17/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer.

18/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, pour le traitement des dermatites, acné, lésions d'hyperkératose, eczéma, ainsi que le vieillissement de la peau et des rides.
10

19/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme additifs alimentaires, en particulier pour compléter la nourriture des nouveaux nés, nourrissons et très jeunes enfants, dans un contexte d'exposition aux polluants arylhydrocarbures polycycliques et/ou halogénés.
15

20/ Utilisation des antagonistes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour imprégner les filtres de cigarettes, afin de délivrer une dose d'antagoniste proportionnelle à la concentration de toxiques absorbée avec la fumée, et conduisant à une concentration sanguine permettant de bloquer l'induction
20 de CYP1A1 et des autres enzymes de phase I au niveau des organes en contact avec les arylhydrocarbures.
25

1/8

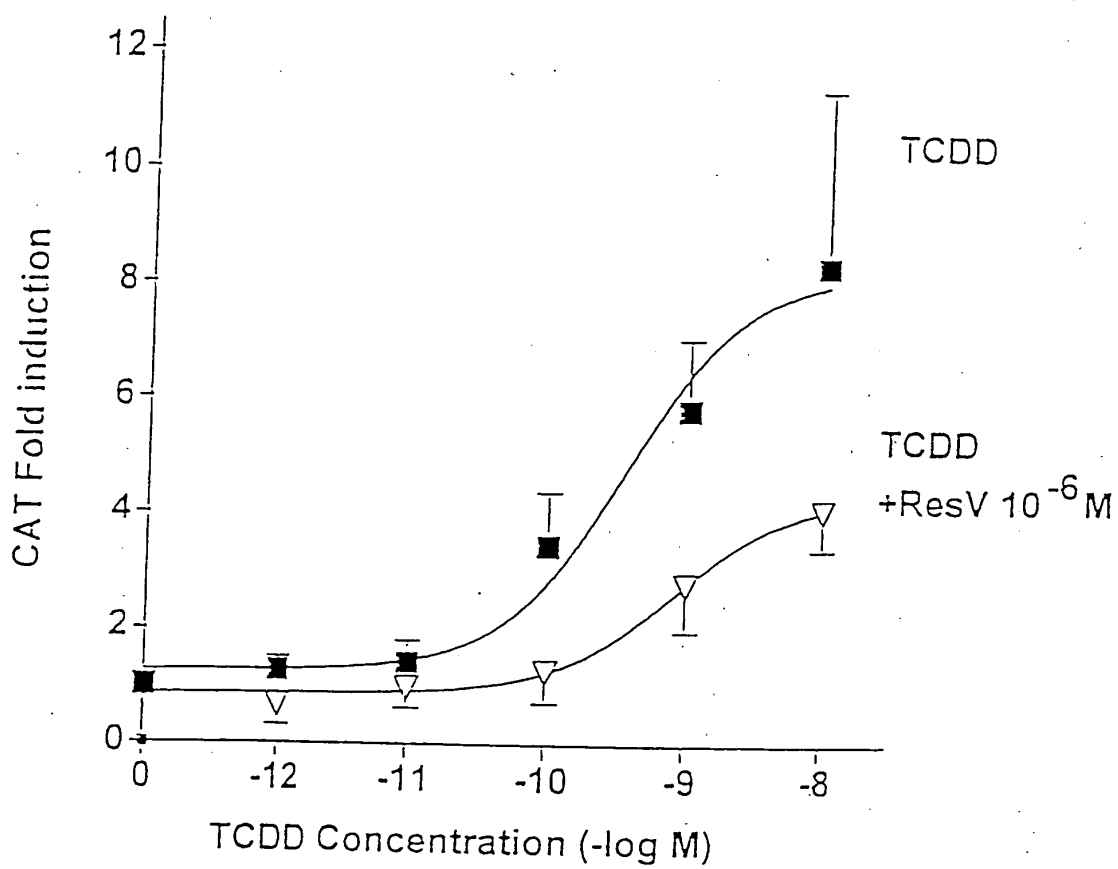


FIGURE 1A

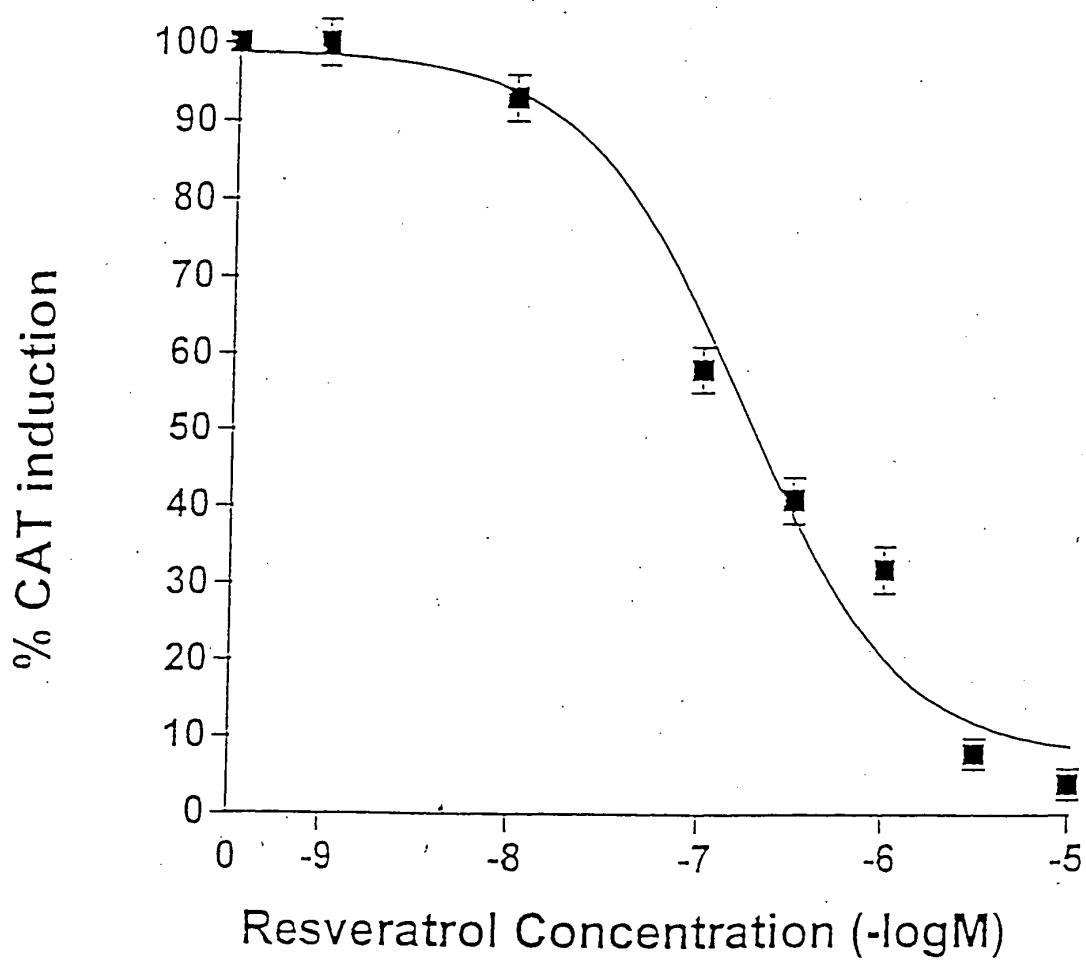


FIGURE 1B

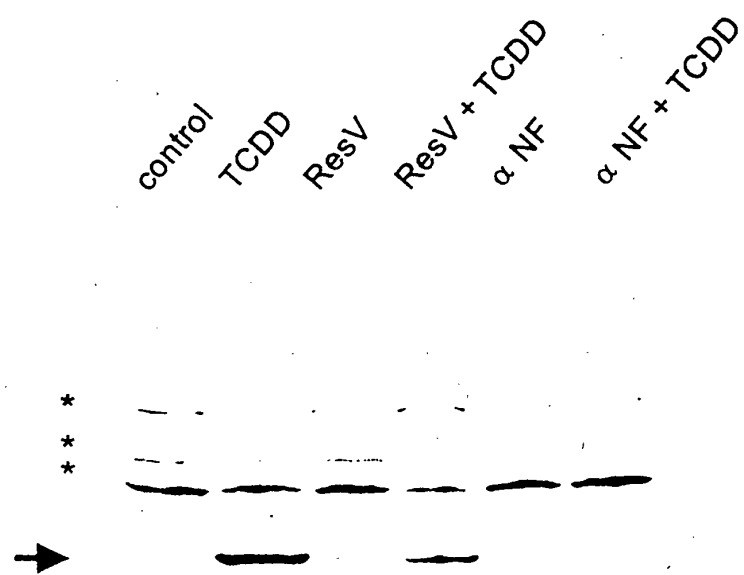


FIGURE 2

4/8

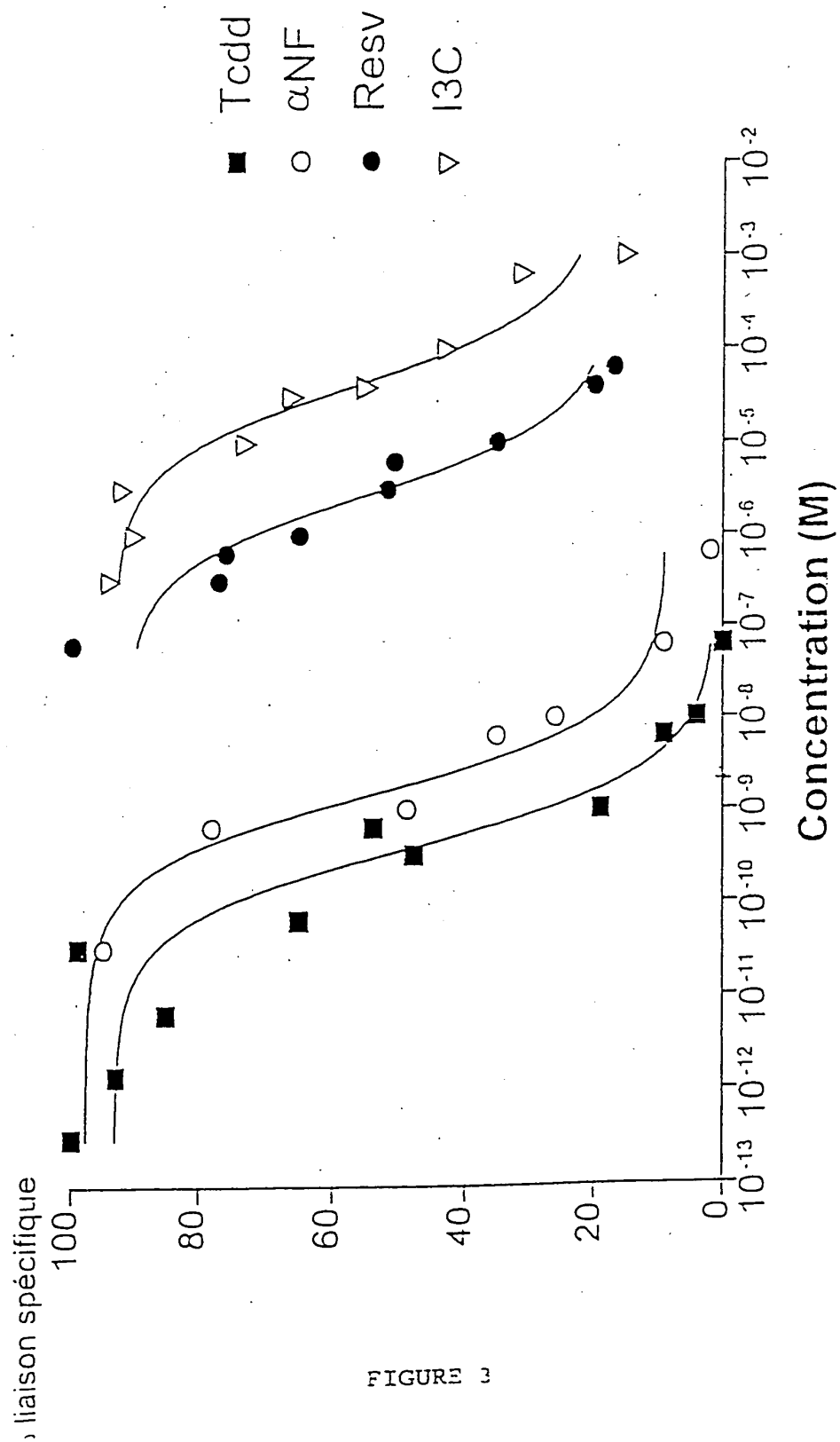


FIGURE 3

5/8

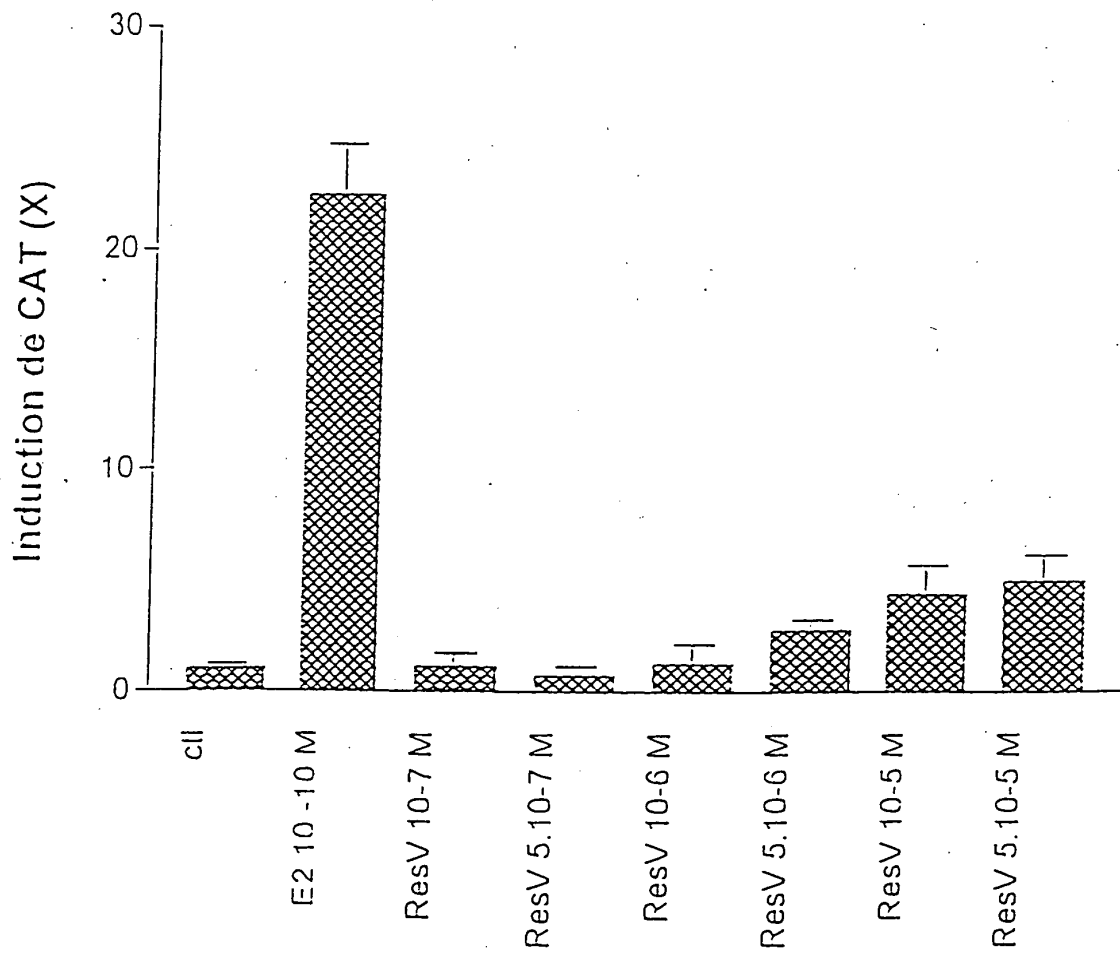


FIGURE 4

6/8

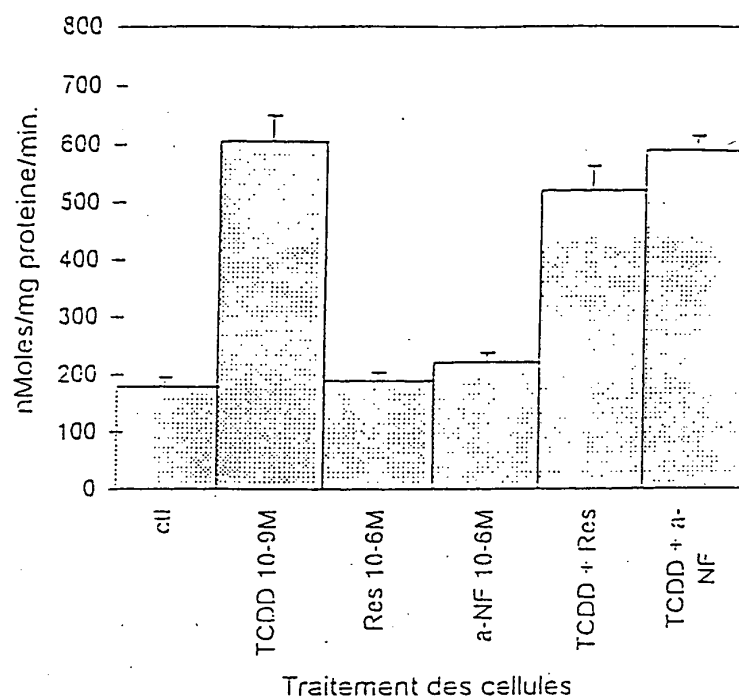


FIGURE 5

7/8

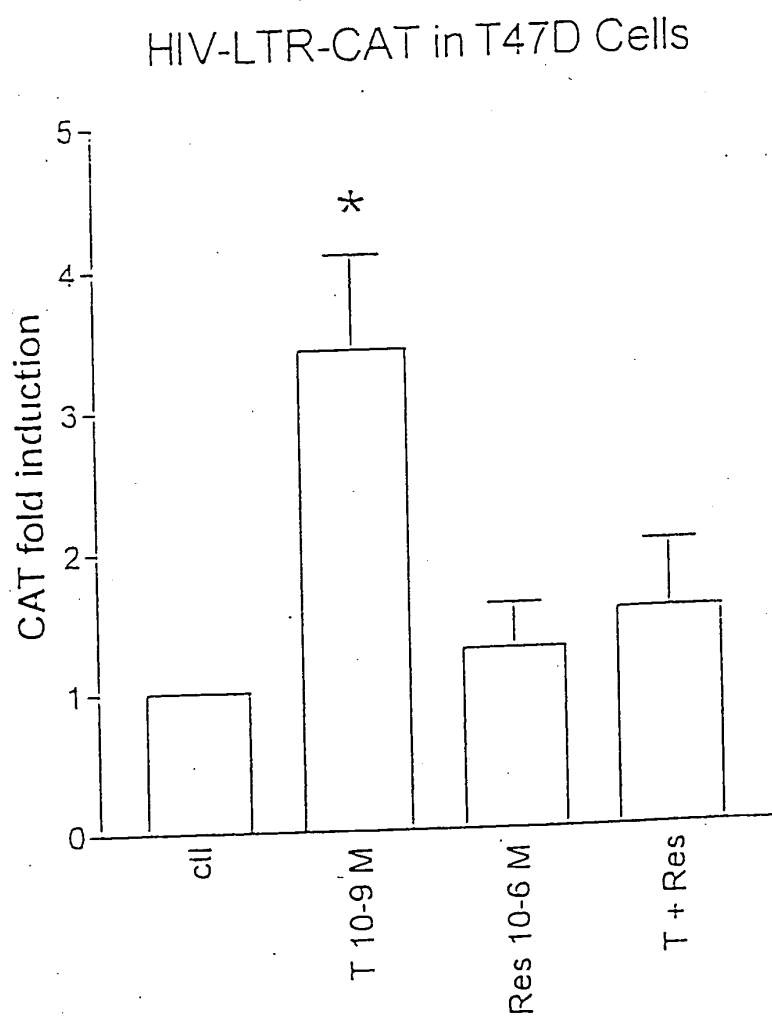


FIGURE 6

8/8

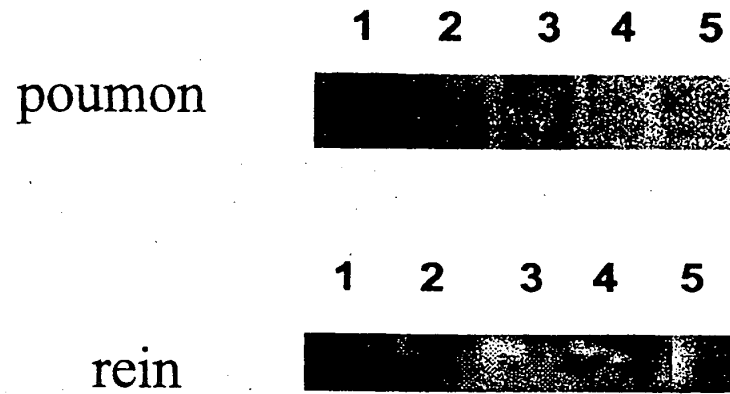


FIGURE 7